

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai Doktori Iskola

Genetika program

Természetes és mesterséges agrobaktérium rezisztencia vizsgálata szőlőben

PhD értekezés tézisei

Galambos Anikó

Témavezető:

Dr. Putnoky Péter
egyetemi tanár

PÉCS, 2014.

1. BEVEZETÉS

Számos kétszikű növény ismert betegsége a patogén agrobaktériumok által okozott tumor, népies nevén gyökér golyva. A fertőzési folyamat során egy bakteriális DNS-szakasz (T-DNS) jut át és épül be a növényi sejt genetikai állományába. A bejuttatott gének növényi növekedési hormon bioszintéziséért (auxin, citokinin) felelős fehérjéket is kódolnak, mely hormonok túlermelése sejtburjánzást, tumorképződést eredményez. Az agrobaktérium fertőzéssel szemben kémiai védekezésre nincs lehetőség, megoldást a tumorképződésnek ellenálló növényfajták létrehozása jelentene, ami történhet hagyományos nemesítéssel, vagy molekuláris biológiai módszerek segítségével.

A termesztett szőlőfajták (*Vitis vinifera*) szintén fogékonyak az agrobaktériumos betegségekre, ami jelentős károkat okozhat a szőlőültetvényekben. Léteznek olyan vad *Vitis* fajok, mint például a *V. amurensis*, vagy a *V. labrusca*, melyek ellenállóak a tumorképződéssel szemben, azonban a rezisztencia genetikai és molekuláris biológiai háttere még nem ismert. Klasszikus keresztezéssel már sikerült bejuttatni a *V. amurensis* eredetű agrobaktérium rezisztenciát a borszőlőbe, és igazolták, hogy a tulajdonság domináns, egy génes, mendeli öröklődésű. Az is kiderült, hogy a különböző patogén *Agrobacterium vitis* és *A. tumefaciens* törzsekkel szemben e gén jelenléte széles hatókörű védettséget biztosít.

A rezisztenciagén azonosítása és működésének megismerése lehetőséget teremtene agrobaktérium rezisztens növények létrehozására. A biotechnológia fejlődésének köszönhetően ma már létrehozhatók olyan genetikailag módosított növények is, melyek csak a bevitt idegen gén (pl. csak az adott rezisztenciagén) tekintetében térnek el a kiindulási fajtától. Különösen fontos szempont ez a szőlő esetében, melynek termesztésében a hagyományörzésnek igen nagy jelentősége van. Géncsendesítés segítségével szintén létrehozhatók olyan agrobaktérium rezisztens transzgenikus növények, melyekben a patogén baktérium által bejuttatott gének megnyilvánulása célzottan gátolt.

Ezen a területen végzett kutatómunkából írtam az itt bemutatott doktori dolgozatomat.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk hosszú távú célja, egyrészt egy *V. amurensis* eredetű domináns és feltételezhetően egygénes *Agrobacterium* rezisztencia (*RcgI*) helyzetének meghatározása a *V. vinifera* genomban, valamint a rezisztencia molekuláris növényélettani alapjainak feltárása. Másrészt vizsgáljuk annak lehetőségét, hogy hogyan lehet mesterséges agrobaktérium rezisztens szőlőt létrehozni géncsendesítés segítségével.

Ezek érdekében a következő közvetlen célokat tűztük ki magunk elé:

- Genetikai térképezés céljából a rezisztens Kunbarát és fogékony Sárfehér fajták keresztezéséből származó utódpopuláció jellemzése különböző *Agrobacterium* törzsekkel történő fertőzések segítségével.
- A jellemzett növények felhasználásával agrobaktérium rezisztenciához kapcsolt polimorfizmusok jellemzése DNS szekvencia szinten, és rezisztencia kapcsolt specifikus DNS markerek kifejlesztése.
- Az *iaaM* onkogén géncsendesítésén alapuló mesterséges rezisztencia kialakítása és jellemzése szőlőnövényekben, valamint a kialakult rezisztencia mértékének jellemzése génexpressziós szinten.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A vizsgálatok növényanyaga és az agrobaktérium fertőzési tesztek

Az eddig még ismeretlen *Agrobacterium* rezisztencia lókusztérképezéséhez a *Vitis amurensis* eredetű rezisztenciát hordozó Kunbarát és a fogékony Sárfehér fajták keresztezésével létrehozott hibridcsalád 272 egyedét használtuk fel. A térképező populáció egyedeiből, valamint a géncsendesítő (pJP17) konstrukciót hordozó dohány és szőlő növényekből származó zölddugványok agrobaktériumokkal szembeni fogékonyságát mesterséges fertőzéssel határoztuk meg. A növények szárát két-három helyen megszártuk különböző patogén *A. tumefaciens* vagy *A. vitis* törzsek szuszpenziójába mártott lándzsátű segítségével. A növényeket üvegházi körülmények között (23-28°C) neveltük és 6 hét után értékeltük a tumorképződéseket.

3.2. DNS technikák, bioinformatikai eszközök

Az alapvető DNS technikákat (összes DNS izolálás, emésztés restrikciós enzimekkel, agaróz gélelektroforézis, ligálás, transzformálás, plazmid DNS izolálás, DNS hibridizáció) a standard módszerek szerint, valamint a felhasznált enzimeket gyártó cég utasításait követve

végeztük. Az izolált fragmenteket pBluescriptIISK vagy pJET1.2 plazmidokba klónoztuk. A tisztított plazmidok és PCR fragmentek szekvenciáját, a megfelelő oligonukleotidok segítségével, az MTA Szegedi Biológiai Központ DNS Szekvenáló Laboratóriumában határozták meg, a BigDye terminátor kit alkalmazásával, Applied Biosystems 373A szekvenáló készüléken.

A részszekvenciákat a Chromas Pro (www.techneysium.com.au/ChromasPro.html) program segítségével ellenőriztük, javítottuk és a Lasergene (DNA Star Inc.) program segítségével illesztettük össze. A szekvenciák elemzésére az NCBI és a Genoscope honlapján elérhető *V. vinifera* genomprojekthez kapcsolt különböző programokat használtuk (BLAST elemzés, szekvencia lekérés): www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi és www.genoscope.cns.fr/cgi-bin/blast_server/projet_ML/blast.pl.

3.3. Rezisztenciához kapcsolt specifikus (SCAR) markerek kifejlesztése

A polimorfizmust mutató RAPD fragmenteket a rezisztens szülői mintából izoláltuk és klónoztuk. A DNS szekvenciák meghatározását követően a fragmentek két végéhez közel terveztünk 18-25 bázis hosszúságú specifikus primereket a PCR Primer Stats program segítségével (bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html). Az így tervezett primerek működését vizsgáltuk a szülőkből és három rezisztens valamint három szenzitív utódból származó DNS-mintákon, hogy tényleg SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) primerként működnek-e, azaz képesek-e egy, a rezisztenciához kapcsolt specifikus fragmentet amplifikálni.

3.4. A géncsendesítő DNS-szakasz beépülésének és expressziójának vizsgálata

A mesterséges agrobaktérium rezisztencia kialakítására az *iaaM* onkogén csendesítésére szolgáló pJP17 vektort használtuk, amely az *A. tumefaciens* A348 törzs *iaaM* szekvenciáját tartalmazta egy mesterséges T-DNS-en. A transzgenikus dohány vonalakat mi állítottuk elő, míg a szőlő vonalakat Dr. Oláh Róbert laboratóriumában (Corvinus Egyetem) hozták létre. A kialakult rezisztencia jellemzésére a növényeket agrobaktérium fertőzéssel teszteltük (lásd 3.1. fejezet). A transzgenikus szőlőnövényekből izolált DNS mintákat a beépült T-DNS számának meghatározása érdekében restrikciós enzimekkel emésztettük. A restrikciós fragmenteket agaróz gélen választottuk el, majd nylon membránra (Hybond-N+, Amersham) vittük át. Próbaként a pJP17 T-DNS egy szakaszát alkalmaztuk, amit a Pharmacia Ready-to-go labeling kit segítségével [α - 32 P]dCTP izotóppal jelöltünk.

A kvantitatív valós idejű PCR vizsgálatokat (qPCR) Step One™ Real-Time PCR System segítségével végeztük (Applied Biosystems). A génexpressziós változások mérésére a Step One™ 2.0 számítógépes programba integrált, relatív kvantifikációt alkalmazó ún. $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmaztuk. Belső kontrollként szolgáló génexpressziós méréseknél az elongációs faktor gént (EF-1 α) választottuk. A cDNS szintézishez random primert, illetve szál specifikus primereket alkalmaztunk. Megmértük a keletkezett duplaszálú RNS mennyiségét és szál specifikus primerek segítségével a kódoló és nem kódoló szál mennyiségét is meghatároztuk.

3.5. Az *A. vitis* AT1 *iaaM* gén szekvenciájának meghatározása és elemzése

A GeneBank nukleotid szekvencia adatbázisban megtalálható *Agrobacterium* törzsek ismert *iaaM* szekvenciáit a ClustalO program segítségével illesztettük és a konzerválódott részeket figyelembe véve, a kódoló szekvencián belül terveztünk primereket az *A. vitis* AT1 *iaaM* szekvencia közepének felsokszorozására. A meghatározott szekvencia az *A. vitis* Tm4 *iaaM* génnel mutatta a legnagyobb azonosságot (97%), ezért ezt vettük alapul a további primerek tervezésénél, hogy izoláljuk és meghatározzuk a gén elejének és végének teljes szekvenciáját. Ez a DNS szekvencia elérhető a nukleotid szekvencia adatbázisokban (FN669137). A géncsendesítési kísérletekben használt *Agrobacterium* törzsek *iaaM* kódoló szekvenciáinak összehasonlítását a ClustalO (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) és az EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html) programok segítségével végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. EGY TERMÉSZETES AGROBAKTÉRIUM REZISZTENCIA GENETIKAI TÉRKÉPEZÉSE

4.1.1. A térképező populáció jellemzése agrobaktérium fertőzéssel

Annak érdekében, hogy agrobaktérium rezisztenciához kapcsolt DNS markereket azonosítsunk, tudnunk kellett, hogy mely utódok ellenállóak és melyek fogékonyak a tumorképződésre. A térképező populáció egyedeinek (272 magonc) agrobaktériummal szembeni fogékonyságát mesterséges fertőzéssel határoztuk meg. A fertőzésekhez különböző típusú Ti-plazmiddal rendelkező baktériumokat használtunk: *A. tumefaciens* C58 (nopalín pTi), *A. vitis* Tm4 (oktopin/cucumopin pTi), AT1 (nopalín pTi) vagy S4 (vitopin pTi). A szenzitív növényeken ejtett sebzési helyeken 6 hét elteltével tumorok képződtek, míg a rezisztens növények esetében csak a sebzési helyek voltak megfigyelhetők.

Az eredmények egységes képet mutattak, vagyis ugyanazon növények klónjai voltak vagy ellenállóak, vagy fogékonyak mindegyik baktériumtörzsszel szemben, így megállapítottuk, hogy a rezisztenciagén jelenléte széles hatókörű rezisztenciát biztosít a növénynek. Végül a teljes utódpopuláció kiértékelését követően 153 ellenálló és 119 fogékony utódot azonosítottunk. Ez megfelel az 1:1 arányú hasadásnak, vagyis a mi kísérleteink is azt igazolják, hogy a rezisztenciagén (*Rcg1*) egygénes, domináns tulajdonság.

4.1.2. Rezisztenciához kapcsolt RAPD markerek tovább fejlesztése specifikus SCAR markerre

A munka kezdetén az OPU07 és az OPX05 dekamer primerekkel, a rezisztenciával kapcsoltságot mutató, Kunbarát specifikus RAPD fragmenteket találtunk. Ezek vizsgálatába kapcsolódtam be. A kapcsolt fragmenteket (OPU07.1, OPX05.1) izoláltuk, klónoztuk és meghatároztuk a szekvenciájukat. A Nukleotid Szekvencia Adatbázissal való összehasonlítás segítségével megállapítottuk, hogy mindkét meghatározott szekvencia homológiát mutat a Pinot Noir 15. kromoszómájának egy-egy egyedi szekvenciájához. A szekvenciák alapján specifikus oligonukleotidokat terveztünk remélve, hogy egyetlen, a rezisztenciához kapcsolt fragmentet fognak felszaporozni. A specifikus primereket először a szülői, valamint három rezisztens és három szenzitív utód DNS mintáin teszteltük. Az OPX05.1 szekvenciához tervezett primerek valóban egy rezisztenciához kapcsolt régiót sokszoroztak fel, a másik primerpár azonban nem így működött. A szekvencia elemzésekből kiderült az is, hogy az OPX05.1 régió egy mikroszatellita szekvenciát is tartalmaz, ami a 15. kromoszóma része. Az összes utód DNS mintáin tesztelve megállapítható volt, hogy az OPX05.1 marker erősen kapcsolt a természetes rezisztenciát biztosító *Rcg1* lókuszhoz, vagyis egy, a genetikai térképezésben és a rezisztenciagén izolálásában is fontos szerepet játszó DNS markert sikerült azonosítanunk.

4.2. MESTERSÉGES AGROBAKTÉRIUM REZISZTENCIA KIALAKÍTÁSA

4.2.1. A transzgenikus szőlővonalak agrobaktérium fogékonysága

Kísérleteinkben egy géncsendesítésre szolgáló vektorral dolgoztunk (pJP17), amely az *iaaM* onkogének működésének gátlására alkalmas, szensz és antiszensz RNS molekulák képződését biztosítja. A konstrukcióval 21 transzgenikus szőlővonalat hoztak létre. Ezeket kaptuk meg a további vizsgálatok elvégzéséhez.

A rezisztencia jelenlétének és hatókörének megállapítása céljából a vegetatívan felszaporított transzgenikus növényeken mesterséges agrobaktérium fertőzést végeztünk A.

tumefaciens A348, C58, *A. vitis* Tm4, AT1 és S4 baktériumokkal. A vizsgálatok eredményei alapján 8 növény mutatott rezisztenciát az *A. tumefaciens* A348 törzzsel szemben, amelynek *iaaM* szekvenciája megegyezett a csendesítő konstrukció szekvenciájával. A rezisztens szőlő vonalak között találtunk három olyan vonalat is, amelyek az *A. vitis* AT1 baktériummal szemben is rezisztensek lettek. Az *A. tumefaciens* C58, *A. vitis* Tm4 és S4 baktériumokkal szemben kivétel nélkül mindegyik vonal fogékonynak bizonyult. Ezen eredmények alapján látható, hogy ezzel az egy konkrét onkogén csendesítésre alkalmas szekvenciával nem lehetett szélesebb körű rezisztenciát kialakítani.

4.2.2. A géncsendesítő szekvencia eltérő expressziót mutat a különböző rezisztens növényekben

A további vizsgálatokban 10 reprezentatív (5 rezisztens és 5 szenzitív) szőlővonallal dolgoztunk. DNS hibridizációs kísérletekben megállapítottuk, hogy egy szenzitív vonal tartalmazott kétszeres T-DNS beépülést, kilenc vonal esetében egyszeres T-DNS kópiaszámot azonosítottunk. Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy az A348 mellett megjelenő AT1 rezisztencia előfordulása összefüggésben van-e a megemelkedett transzgén expressziós szinttel, valós idejű PCR kísérleteket végeztünk, és megvizsgáltuk az *iaaM* szekvencia kódoló és nem kódoló szálának átírási szintjét. A rezisztens növényekben 50-120-szor magasabb kifejeződési szintet mértünk, mint a szenzitív növényekben. A legmagasabb RNS szintet egy dupla (A348 és AT1) rezisztens növényben mértük, de az öt rezisztens növény esetében nem találtunk szoros összefüggést a rezisztencia spektruma és a transzgén expressziós szintje között.

4.2.3. Az *iaaM* szekvenciák közti hasonlóságok nem magyarázzák az eltérő rezisztencia spektrumot

A géncsendesítésben tapasztalható különbségek okának megválaszolására összehasonlítottuk a fertőzéshez használt törzsek *iaaM* génjeinek kódoló szekvenciáit. Az *A. vitis* AT1 törzs *iaaM* génjének szekvenciája nem volt megtalálható az adatbázisban, így ezt mi határoztuk meg (lásd 3.5. fejezet). Azt vártuk, hogy a géncsendesítés annál hatékonyabb, minél inkább hasonlít két szekvencia egymásra. A vizsgálatban felhasznált agrobaktérium törzsek *iaaM* szekvenciáit összehasonlítva (1. táblázat), ehhez képest két ellentmondást is találtunk. Ezek alapján nincs mindig szoros összefüggés a csendesítés hatásossága és a szekvenciák hasonlósága között. A csendesítő (A348) konstrukciót tartalmazó N^o3 szőlő vonal (és még két másik vonal) esetében a csendesítés 89% azonosság mellett az AT1 törzzsel

szemben hatásosan működött, ugyanakkor a Tm4 törzzsel szemben nem. Ennél is váratlanabb, hogy a C58 törzzsel szemben sem bizonyult hatásosnak a csendesítő szekvencia, bár ebben az esetben 94% az azonosság.

1. táblázat: A géncsendesítés hatásossága és az *iaaM* szekvenciák hasonlósága

<i>iaaM</i> szekvenciák	<i>A.t.</i> A348	<i>A.t.</i> C58	<i>A.v.</i> AT1	<i>A.v.</i> Tm4	<i>A.v.</i> S4
csendesítő (<i>A.t.</i> A348)	100%	94%	89%	89%	53%
N ^o 3, N ^o 23 és N ^o 62 növények	R	Sz	R	Sz	Sz

A.t.: *A. tumefaciens*, A.v.: *A. vitis*, N^o3, N^o23, N^o62: transzgenikus szőlővonalak, **R**: rezisztens (sikeres csendesítés), Sz: szenzitív (nincs csendesítés)

Úgy tűnik, hogy a DNS hasonlóságon kívül más faktorok is szerepet játszanak a géncsendesítés sikerességében. A megemelkedett növényi növekedési hormonszint gátolhatja a géncsendesítés folyamatát. Néhány *Agrobacterium* törzs képes lehet olyan gyorsan túltermeltetni ezeket a hormonokat, hogy az onkogén csendesítés hatását elnyomja. Az is lehetséges, hogy néhány *Agrobacterium* törzs képes kivédeni a géncsendesítést a vírusokban már ismert szupresszor fehérjék segítségével.

5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- Vizsgálataink megerősítették, hogy a rezisztenciagén jelenléte széles spektrumú ellenállóképességet biztosít a különböző *A. tumefaciens* és *A. vitis* törzsekkel szemben, és hogy az *Rcg1* lókuszt a domináns, egygénes tulajdonságra jellemző módon öröklődik (1:1 arányú hasadás).
- Sikerült egy RAPD markerből specifikus SCAR markert kifejlesztenünk (OPX05.1) és ezzel bizonyítani, hogy az *Rcg1* rezisztenciagén a 15. kromoszómán helyezkedik el.
- Igazoltuk, hogy az *iaaM* gén csendesítésével szőlőben is lehetséges mesterséges agrobaktérium rezisztencia kialakítása.
- Részben korrelációt találtunk a géncsendesítő konstrukció expressziós szintje, illetve az *iaaM* szekvenciák közötti hasonlóság és a rezisztencia kifejeződése között.
- Eredményeink szerint a DNS hasonlóságon kívül más bakteriális és növényi faktorok is szerepet játszhatnak a géncsendesítés sikerességében, így ezen az alapon működő, átfogó rezisztencia kialakítása számos nehézségbe ütközik.

PUBLIKÁCIÓK

A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények:

Galambos, A., Zok, A., Kuczmog, A., Oláh, R., Putnoky, P., Ream, W., Szegedi, E. (2013) Silencing *Agrobacterium* oncogenes in transgenic grapevine results in strain-specific crown gall resistance. *Plant Cell Rep*, **32**:1751-1757 (IF:2,509)

Kuczmog, A., **Galambos, A.,** Horváth, Sz., Mátai, A., Kozma, P., Szegedi, E., Putnoky, P. (2012) Mapping of crown gall resistance locus *Rcg1* in grapevine. *Theor Appl Genet*, **125**:1565-1574 (IF:3,658)

Összesített impakt faktor: **6,167**.

A disszertáció témakörében készült konferencia előadások és poszterek:

Kuczmog Anett, **Galambos Anikó,** Kozma Pál, Szegedi Ernő, Putnoky Péter (2009) Agrobaktérium rezisztencia térképezése szőlőben. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, Magyarország. PG28, poszter absztrakt.

Galambos Anikó, Zok Anikó, Kuczmog Anett, Putnoky Péter, Oláh Róbert, Szegedi Ernő (2011) Mesterséges *Agrobacterium* rezisztencia kialakítása szőlőben. IX. Magyar Genetikai Kongresszus, XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, Magyarország. P064, poszter absztrakt.

Kuczmog Anett, **Galambos Anikó,** Kozma Pál, Szegedi Ernő, Putnoky Péter (2011) Az *Agr1* *Agrobacterium* rezisztencia lokusz térképezése szőlőben. IX. Magyar Genetikai Kongresszus, XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, Magyarország. P093, poszter absztrakt.

Kuczmog Anett, **Galambos Anikó,** Horváth Szabina, Kozma Pál, Szegedi Ernő, Putnoky Péter (2011) Az *Agr1* *Agrobacterium* rezisztencia lokusz térképezése szőlőben. XVII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, Magyarország. Program összefoglalók 45. oldal, előadás absztrakt.

Horváth Szabina, Kuczmog Anett, **Galambos Anikó,** Kozma Pál, Szegedi Ernő, Putnoky Péter (2013) *Agrobacterium* rezisztencia lokusz genetikai térképének pontosítása szőlőben. II. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs, Magyarország. P4.5, poszter absztrakt.

Egyéb konferencia előadások és poszterek jegyzéke:

Galambos Anikó, Stranczinger Szilvia, Borhidi Attila (2009) Génusz- és fajsztípus molekuláris filogenetikai vizsgálatok a Rubiaceae család Hamelieae szekciójában., VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, Magyarország. PG21, poszter absztrakt.

Stranczinger Szilvia, **Galambos Anikó**, Borhidi Attila (2010) Phylogenic study on genus and species level of the Deppea complex (Hamelieae Section) The Fifth International Rubiaceae and Gentianales Conference, Biodiversity in the light of historical information, Stockholm, Sweden. P58, poszter absztrakt.

Stranczinger Szilvia, Szalontai Bálint, **Galambos Anikó**, Borhidi, Attila (2012) A Deppea-komplex (Rubiaceae, Hamelieae) szövedékének integratív filogenetikai felfejtése., „Egy új korszak kezdetén...” Molekuláris biológiai módszerek az ökológiai és taxonómiai kutatás szolgálatában, Budapest, Magyarország, előadás.